

اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان قندهای محلول پونه معطر (*Mentha pulegium L.*)

منصور افشار محمدیان^{*}، فائزه قناتی^۲، سارا احمدیانی^۱ و کمال صدر زمانی^۱

دریافت: ۱۳۹۴/۳/۱۵ / پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۲۴ / چاپ: ۱۳۹۵/۹/۳۰

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۲گروه علوم گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: afshar@guilan.ac.ir

چکیده. پونه معطر (*Mentha pulegium L.*) از خانواده نعنایان، گیاهی دارویی است که خواص آنتی‌اکسیدانی فراوانی دارد. تنش‌های محیطی مانند خشکی می‌تواند سبب تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای بیوشیمیایی گیاهان شود. در این تحقیق اثر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیدیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، پراکسیداز، قندهای محلول و محتوی مالونی‌آلدید اندام هوایی و ریشه پونه معطر ارزیابی شد. برای ایجاد تنش کمبود آب، گیاهچه‌های ۲۴ روزه پونه معطر به مدت ۲۴ ساعت در محلول ۱/۲ هوگلندر حاوی غلظت‌های PEG 6000 (صفرا و ۵ درصد (w/v)) قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تنش خشکی موجب افزایش فعالیت کاتالاز و میزان پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش فعالیت سوپراکسیدیسموتاز و پراکسیداز اندام هوایی و افزایش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز ریشه پونه معطر شد. فعالیت آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی و ریشه تفاوت معنی‌داری را در گیاهان تحت تیمار نشان نداد. تنش خشکی نیز سبب افزایش میزان قندهای محلول گلوكز، غالاكتوز، رامنوز و زایلوز در اندام هوایی شد. بنابراین، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین افزایش میزان قندهای محلول تحت تنش خشکی در پونه معطر می‌تواند نشانه‌ای از تحمل نسبی این گیاه به سطوح پایین خشکی باشد.
واژه‌های کلیدی. کاتالاز، پراکسیداسیون لیپیدی، نعنایان، کم آبی

Effect of drought stress on the activity of antioxidant enzymes and soluble sugars content of pennyroyal (*Mentha pulegium L.*)

Mansour Afsharmohammadi^{۱*}, Faezeh Ghanati^۲, Sara Ahmadiani^۱ & Kamal Sadrzamani^۱

Received 05.06.2015 / Accepted 13.06.2016 / Published 20.12.2016

^۱Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran

^۲Department of Biology, University of Tarbiat Modarres, Tehran, Iran

*Correspondent author: afshar@guilan.ac.ir

Abstract. Pennyroyal (*Mentha pulegium L.*) from the Lamiaceae family is a medicinal plant which has great antioxidant properties. Environmental stresses such as drought can result in changes in the activity of antioxidant enzymes and the content of some biochemical factors in plants. In this investigation, the effects of drought stress on the activity of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase, peroxidase, malondialdehyde and soluble sugars content in pennyroyal shoots and roots were evaluated. To create the water deficit, 24-day seedlings of pennyroyal were placed in 1/2 strength Hoagland solution, containing PEG 6000 (0 and 5% (w/v)) for 24 hours. The results showed that drought stress increased catalase activity and lipid peroxidation and decreased superoxide dismutase and peroxidase activity of the shoots. On the other hand, the activity of catalase and peroxidase increased in the roots. Ascorbate peroxidase activity showed no significant difference in the shoots and the roots. Moreover, drought stress significantly increased the amount of soluble sugars of glucose, galactose, xylose and rhamnosus in the shoots. Therefore, the increased activity in antioxidant enzymes as well as the amount of soluble sugars under drought stress might be a sign of tolerance of *M. pulegium* under low levels of drought.

Keywords. catalase, lipid peroxidation, Lamiaceae, water deficit

مقدمه

مصارف دارویی استفاده می‌شود (Hajlaoui *et al.*, 2009) از جمله خواصی که به گونه‌های مختلف نعنایان (Lamiaceae) دارد می‌توان به این موارد اشاره کرد: ضدباکتریایی، ضدخوارش، ضدتومر، درمان ناراحتی‌های معده، درمان ناراحتی‌های کبدی،

جنس نعناع (*Mentha*) یکی از مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین گیاهان متعلق به خانواده نعنایان (Lamiaceae) است و قدمت استفاده از گونه‌های آن به دوهزار سال قبل برمی‌گردد. از برگ‌ها، ساقه‌ها و اسانس گونه‌های مختلف جنس نعناع برای

فتوسترن تحت وضعیت کم آبی، نشت بالای الکترون به سمت O_2^- اتفاق می‌افتد و انواع مختلف ROS نظیر سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و رادیکال اکسیژن تولید می‌کند. گیاهان جهت مقابله با تنفس اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن، سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی دارند. رادیکال سوپراکسید ممکن است به وسیله آنزیم سوپراکسیدیسموتاز تبدیل به H_2O_2 شود و سپس به وسیله آسکوربات‌پراکسیداز در کلروپلاست تبدیل به آب شود. همچنین H_2O_2 منتشر شده به قسمت بیرونی کلروپلاست به وسیله آنزیم کاتالاز در سلول‌های برگ پاک‌سازی می‌شود. در وضعیت خشکی به دلیل محدود شدن جذب و ثبیت CO_2 و افزایش فعالیت اکسیژن‌تازی آنزیم رویسکو، تنفس نوری افزایش می‌یابد که این امر نیز افزایش تولید H_2O_2 را به همراه خواهد داشت (Miller, 2010). گزارش شده است که تنفس نوری ۷۰ درصد کل میزان H_2O_2 تولید شده در خشکی را سبب می‌شود (Noctor et al., 2002; Cruz de Carvalho, 2008).

آنزیم کاتالاز (CAT) و آسکوربات‌پراکسیداز (APX) در حذف H_2O_2 نقش مهمی ایفا می‌کنند و هر کدام میل ترکیبی متفاوتی با این نوع ROS دارند. افزایش فعالیت CAT دهنده مهار کارآمد H_2O_2 توسط این آنزیم است که این افزایش در نتایج تحقیقات انجام شده درباره برخی گونه‌های تیره (Wen-Bin et al., 2006)، (Ozen et al., 2006)، یونجه (Zhong-Jing et al., 2009)، کدو (Mittler, 2002) و آسکوربات‌پراکسیداز (Cruz de Carvalho, 2008) است. کاتالاز برای عمل، به نیروی احیایی نیاز ندارد، ولی آسکوربات‌پراکسیداز جهت فعالیت به عامل احیایی نیاز دارد. سطح تمایل کاتالاز به H_2O_2 پایین‌تر از آسکوربات‌پراکسیداز است. آسکوربات‌پراکسیداز در بیشتر اندامک‌های سلولی وجود دارد، درحالی که کاتالاز فقط در پراکسیزوم یافت می‌شود. با توجه به این دلایل پیشنهاد شده است که آسکوربات‌پراکسیداز ممکن است یک تنظیم کننده و کنترل کننده داخل سلولی خوبی جهت حفظ تعادل ROS باشد (Mittler, 2002).

از جمله سازوکارهای پاسخ به تنفس‌های محیطی، تنظیم اسمزی است. تنظیم اسمزی، نوعی سازگاری با تنفس کمبود آب است که از طریق تجمع مواد محلول درون سلول‌ها، می‌تواند به حفظ تورژسانس سلول‌ها و فرآیندهای وابسته به آن در پتانسیل‌های

خشی کننده رادیکال‌های آزاد وغیره (Hussain et al., 2010; Kamkar et al., 2010; Cherrat et al., 2014). پونه‌معطر (*Mentha pulegium* L.) گیاهی دارویی، علفی و پایا است که به حالت وحشی در دشت‌های مرطوب و حاشیه جریان‌های آب می‌روید و بومی اروپا، آفریقای شمالی و آناتولی است (Chalchat et al., 2000). در ایران در دامنه‌های شمال و شمال شرقی البرز، به خصوص نواحی مرطوب گیلان و مازندران و برخی نقاط دیگر، انتشار دارد (Jafari et al., 2013). پونه معطر در گیلان به خالواش مشهور و گیاهی به شدت معطر است و به صورت سبزی خوراکی، طعم‌دهنده، دمنوش گیاهی وغیره استفاده می‌شود (Nickavar et al., 2008). انسان پونه‌معطر از نظر دارویی، غذایی و صنعتی بسیار توجه‌برانگیز است. بخش‌های مختلف پونه‌معطر کاربرد دارویی دارد و اندام هوایی آن به طور سنتی برای درمان بسیاری از بیماری‌های گوارشی و التهاب مجاری تنفسی استفاده می‌شود (Naghibi et al., 2005). از برخی مصارف دارویی انسان آن می‌توان به فعالیت ضدسلطانی در برابر لاین‌های مختلف سلول‌های انسانی (Shirazi et al., 2004; Nikolić et al., 2014) و ضدآپاسم عضلانی (Soares et al., 2012) میکروبی، ضدقارچ و فعالیت آنتی‌اکسیدانی انسان و عصاره مтанولی این گیاه در پژوهش‌های دیگری نیز بیان شده (Mahboubi & Haghi, 2008; Shahmohamadi et al., 2011, 2014).

تنش خشکی از جمله تنفس‌های محیطی است که علاوه‌بر کاهش رشد رویشی و تغییر در ساختارهای آناتومیکی گیاه، از طریق ایجاد تنفس ثانویه نظیر تنفس اکسیداتیو، سبب تغییر در مسیرهای ستنز ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Foyer et al., 1994; Sharma et al., 2012) مطالعات فراوانی حاکی از افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تحت تنش خشکی گزارش شده است. گیاهان از طریق سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی گونه‌های فعال اکسیژنی ایجاد شده را کاهش می‌دهند (Cruz de Carvalho, 2008; Miller et al., 2010; Hasanuzzaman et al., 2014). تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در سلول موجب آسیب‌رساندن به لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود. در طی

۶ روز، گیاهچه‌ها به محیط کشت محلول ۱/۲ هوگلند (شدت نور محیط $410\text{ m}^{-2}\text{ Ms}^{-1}$ ، فتوپریود ۱۶ ساعت روز و ۸ ساعت تاریکی، دمای $23\pm 2^\circ\text{C}$ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰درصد) منتقل شدند. تعویض محیط کشت هر ۴۸ ساعت یک بار انجام شد. بعداز ۱۸ روز از استقرار گیاهچه‌ها، ۶۰۰۰ PEG جهت ایجاد تنش خشکی در دو غلظت صفر و ۵ درصد به بستر کشت هیدروپونیک اضافه شد و گیاهچه‌های ۲۴ روزه ۲۴ ساعت تحت تأثیر تنش قرار گرفتند و پس از آن جهت سنجش فعالیت آنزیم‌ها و تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدی و تغییرات قندهای محلول، گیاهچه‌ها در نیتروژن مایع منجمد شدند و تا زمان انجام تحلیل‌های بیوشیمیایی در فریزر -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

فعالیت سوپراکسیدیسموتاز

براساس روش Giannopolitis و Ries (1977)، ۰/۲ گرم نمونه منجمد گیاهی از بخش هوایی و ریشه نمونه‌های شاهد و تحت تیمار را به تفکیک در ۳ میلی لیتر بافر HEPES-KOH با pH ۷/۸ حاوی ۰/۱ میلی مولار در هاون روی یخ سایده شد و عصاره با استفاده از کاغذ صافی صاف شد. محلول‌های شد و عصاره با استفاده از کاغذ صافی صاف شد. محلول‌های همگن حاصل در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و بخش‌های رویی برای سنجش فعالیت سوپراکسیدیسموتاز استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور قرار گرفت و سپس جذب آنها در طول ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. همچنین از یک لوله آزمایش حاوی مخلوط واکنش به جز عصاره آنزیمی به منزله شاهد (پلانک) استفاده شد. مخلوط واکنش شامل بافر HEPES-KOH pH ۵/۰ میلی مولار با حاوی ۰/۱ میلی مولار، کربنات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH ۱۰/۲، ۱۲ میلی مولار، نیتروبلو ترازو لیوم ۷۵ میکرومولار، ریوفلاوین ۱ میکرومولار و ۳۰۰ ماکرولیتر عصاره آنزیمی بود.

فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز

براساس روش Nakano و Asada (1981)، ۰/۲ گرم نمونه منجمد گیاهی از بخش هوایی و ریشه نمونه‌های شاهد و تحت تیمار، به تفکیک با ۳ میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷/۸ حاوی ۵ میلی مولار، دی‌تیوتیوتول ۵ میلی-

پایین آب منجر شود. در زمان تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، مولکول‌های آلی با وزن مولکولی کمتر مانند قندهای محلول، پروولین، پروتئین، بتائین در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی گیاهان به منزله تنظیم کننده‌های اسمزی عمل می‌کنند (Lokhande *et al.*, 2010). قندهای محلول به منزله تنظیم کننده‌های اسمزی، ثبات-دهنده غشاها سلولی و حفظ کننده تورژسانس سلول‌ها عمل می‌کنند. در حقیقت، در گیاهانی که قندهای محلول در پاسخ به تنش خشکی تجمع می‌یابند، تنظیم اسمزی بهتر صورت می‌گیرد (Slama *et al.*, 2007).

در موقعیت آزمایشگاهی، جهت مشاهده صدمات ناشی از تنش خشکی از ماده Polyethylene glycol (PEG) استفاده می‌شود (Sivritepe *et al.*, 2008). PEG مولکول‌هایی با وزن مولکولی زیاد است که پتانسیل آب را بهروشی مشابه با خشکی خاک کاهش می‌دهد (Van Den Berg & Zeng, 2006).

مطالعات اخیر در باب اثر تنش خشکی بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه پونه معطر در مرحله رویشی، نشان داده است که این گیاه دارای پتانسیل کشت در موقعیت خشکی است (Candan & Tarhan, 2012; Hassanpour *et al.*, 2013) با توجه به ویژگی‌های گیاه پونه معطر به لحاظ ارزش دارویی و مصرف غذایی و از طرفی فقدان اطلاعات کافی درباره ویژگی‌های این گیاه در اوضاع نامساعد اقلیمی نظری خشکی، این تحقیق به منظور بررسی اثر خشکی بر تغییرات برخی آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی (سوپراکسیدیسموتاز، آسکوربات‌پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز) و نیز بررسی میزان پراکسیدشدن لیپیدهای غشایی و تغییرات برخی قندهای محلول سلول‌های پونه معطر انجام شد.

مواد و روش‌ها

بذر پونه معطر از مرکز تحقیقات کشاورزی استان گیلان تهیه شد. به منظور انجام ضد عفونی سطحی، بذرها به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد (حجم/وزن) قرار داده شدند و پس از ۵ بار شست و شو با آب مقطر استریل، به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و دوباره با آب مقطر استریل شسته شدند. سپس، جهت جوانه‌زنی بذرها، آنها را در محیط کشت LS (Linsmaier & Skoog, 1965) قرار گرفتند و بعداز گذشت

تعیین پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء

براساس روش De Vos و همکاران (1991) و از طریق اندازه‌گیری مالون دی‌آلدهید به مثابهٔ فرآوردهٔ نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشاء انجام شد. نمونه‌های منجمد شده به میزان 0.3 g در 3 mL لیتر تری کلرواستیک اسید 10 mL درصد (وزن به حجم) در هاون روی یخ ساییده و عصاره‌گیری شد و سپس به 1 mL لیتر از سوسپانسیون صاف شده، 1 mL لیتر تیوباربی‌توريک اسید 0.5 mL درصد (وزن به حجم) به هر کدام از نمونه‌ها اضافه شد و در حمام آب 2 g درجهٔ سانتی گراد به-مدت 30 min دقيقه قرار گرفت. لوله‌ها از حمام خارج شد و پس از سردشدن، میزان مالون دی‌آلدهید با اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های 532 nm و 600 nm و با استفاده از ضریب خاموشی $\text{M}^{-1}\text{Cm}^{-1} (\epsilon = 155)$ محاسبه شد.

اندازه‌گیری قندهای محلول

برای اندازه‌گیری مقدار قندهای محلول، 0.2 g از بخش‌های هوایی و ریشه‌گیاه به طور جداگانه در 4 mL لیتر بافر سدیم-فسفات 25 mL میلی‌مولاو ($\text{pH } 6/8$) ساییده و محلول رویی جهت اندازه‌گیری قند کل استفاده شد. برای اندازه‌گیری قند نمونه، به هر لوله 0.5 mL لیتر محلول قندی، 0.5 mL لیتر فل ۵ درصد و $2/5\text{ mL}$ لیتر اسید سولفوریک خالص اضافه شد. محلوت واکنش 10 min در دمای اتاق خنک شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف قندهای گلوکز، گالاکتوز، رامنوز و زایلوز، از صفر تا 30 mg میکرو گرم در 1 mL لیتر ترسیم شد. جذب استانداردها، به همراه جذب نمونه، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل GBC Cintra 6) در طول موج‌های 480 (رامنوز، زایلوز) و 485 (گلوکز، گالاکتوز) نانومتر اندازه‌گیری و مقدار قند نمونه بر مبنای میکرو گرم بر گرم وزن تر نمونه تعیین شد (Dubois *et al.*, 1956).

تجزیه آماری

آزمایش برپایهٔ طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و برای تجزیه واریانس داده‌ها از نرم افزار SPSS استفاده شد. برای مقایسه میانگین از آزمون دانکن در سطح احتمال 5% درصد استفاده شد و نمودارها نیز با کمک نرم افزار Excel رسم شد.

نتایج

اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم سوپراکسیدیسموتاز

مولار، کلریدسدیم 100 mL میلی‌مولاو و پلی‌وینیل پیرولیدون 2 mL درصد (وزنی به حجمی)، در هاون روی یخ ساییده و عصاره با استفاده از کاغذ صاف شد. محلول‌های همگن حاصل در 15000 rev در دقیقه، به مدت 15 min در دمای 4°C درجهٔ سانتی گراد سانتریفیوژ شد و محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز استفاده شد. محلوت واکنش شامل بافر سدیم فسفات 5 mL میلی‌مولاو، آب اکسیژن 44 mL میکرومولاو، آسکوربات 5 mL میلی‌مولاو و عصاره آنزیمی بود. کاهش جذب آسکوربات در طول موج 290 nm تعیین و به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در عصاره آنزیمی بیان شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز به روش Cakmak و Horst (1991) انجام شد. 0.2 g از نمونه منجمد گیاهی در 3 mL لیتر بافر سدیم فسفات 25 mL میلی‌مولاو با $\text{pH } 6/8$ در هاون روی یخ ساییده و عصاره با استفاده از کاغذ صافی صاف شد. محلول‌های همگن حاصل در 15000 rev در دقیقه، به مدت 15 min درجهٔ سانتی گراد سانتریفیوژ شد و محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده شد. محلوت واکنش شامل بافر سدیم فسفات 25 mL میلی‌مولاو، آب اکسیژن 10 mL میلی‌مولاو و عصاره آنزیمی است. تجزیه آب اکسیژن با کاهش جذب در طول موج 240 nm تعیین و به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در عصاره آنزیمی بیان شد.

فعالیت آنزیم پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز بر طبق روش Ghanati و همکاران (2002) انجام شد. 0.2 g از بافت تازه منجمد شده در نیتروژن مایع در بافر پتاسیم فسفات 60 mL میلی‌مولاو ($\text{pH } 6/1$) در دمای 4°C درجهٔ سانتی گراد در هاون روی یخ ساییده و عصاره با استفاده از کاغذ صافی صاف شد. محلول‌های همگن حاصل در 12000 rev در دقیقه در دمای 4°C درجهٔ سانتی گراد به مدت 15 min درجهٔ سانتی گراد سانتریفیوژ شد و محلول رویی جهت اندازه‌گیری فعالیت پراکسیداز استفاده شد. فعالیت آنزیمی با افزودن مقادیر مناسب از عصاره آنزیمی، بافر، گایاکول با غلظت نهایی 28 mL میلی‌مولاو و پراکسید هیدروژن با غلظت نهایی 5 mL میلی‌مولاو در طول موج 470 nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده و به ازای تغییرات جذب به میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان شد.

تحت تنش خشکی، در ریشه پونه معطر نسبت به نمونه‌های شاهد مشاهده نشد.

بحث

تنش خشکی منجر به القای تولید انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. سطح بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی جاروب کننده رادیکال‌های آزاد موجود در گیاهان، میان افزایش تحمل آن‌ها به تنش‌های محیطی است (Hojati *et al.*, 2011).

براساس نتایج این تحقیق، سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در اندام هوایی پونه معطر در اثر تنش خشکی کاهش معنی‌داری نشان داد، ولی در میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز ریشه تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. به‌طور کلی، سطح فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در اندام هوایی نمونه‌های شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از ریشه بود (شکل ۱A).

براساس نتایج این تحقیق، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در اندام هوایی پونه معطر در اثر تنش خشکی کاهش معنی‌داری نشان داد، ولی در میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز ریشه تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. به‌طور کلی، سطح فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در اندام هوایی نمونه‌های شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از ریشه بود (شکل ۱A).

اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

نتایج این تحقیق نشان داد که هرچند تنش خشکی سبب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی و کاهش فعالیت آن در ریشه پونه معطر شد، هیچ‌کدام از این تغییرات معنی‌دار نبودند. به‌طور کلی، سطح فعالیت آسکوربات پراکسیداز در ریشه نمونه‌های شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از اندام هوایی بود (شکل ۱B).

اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج این آزمایش نشان داد که تنش خشکی سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی و ریشه پونه معطر شد. ضمن اینکه سطح فعالیت کاتالاز در اندام نمونه‌های شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از سطح فعالیت کاتالاز ریشه بود (شکل ۲A).

اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز

براساس نتایج این تحقیق، تنش خشکی سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز در اندام هوایی و افزایش معنی‌دار فعالیت آن در ریشه پونه معطر شد. همچنین به‌طور کلی، سطح فعالیت پراکسیداز نمونه‌های شاهد در اندام هوایی بیشتر از ریشه بود (شکل ۲B).

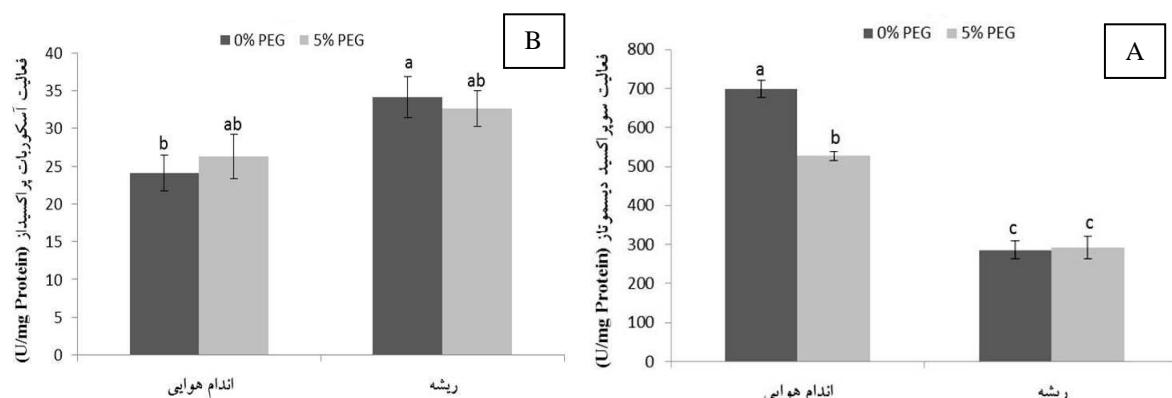
اثر تنش خشکی بر میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی

براساس نتایج بدست آمده، تنش خشکی سبب افزایش معنی‌دار محتوی مالون دی‌آلدهید (MDA) در اندام هوایی پونه معطر شد، ولی به تغییر معنی‌دار محتوی MDA در ریشه پونه معطر منجر نشد (شکل ۳).

اثر تنش خشکی بر میزان قندهای محلول

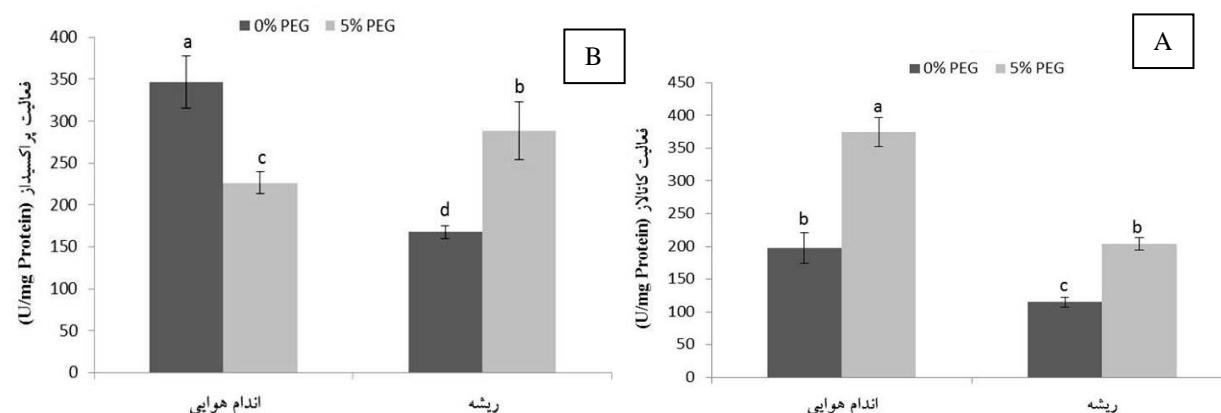
نتایج این آزمایش نشان داد که تنش خشکی سبب افزایش معنی‌دار قندهای محلول گلوکز (شکل ۴A)، گالاكتوز (شکل ۴B)، رامنوز (شکل ۵A) و زایلوز (شکل ۵B) در اندام هوایی پونه معطر شد. همچنین تفاوت معنی‌داری در سطح قندهای مذکور

آسکوربات پراکسیداز در سمزدایی هیدروژن پراکسید تولید شده در اثر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز نقش دارد. در این تحقیق، فعالیت آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی و ریشه پونه معطر تحت تنش خشکی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. مطالعه بر روی گیاهی از تیره علف‌ماریان نیز نتیجه مشابهی از عدم افزایش



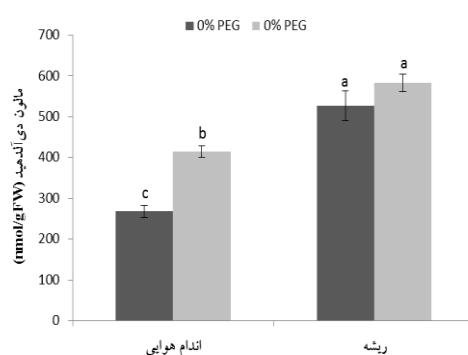
شکل ۱- اثر تنش خشکی بر A: میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و B: آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی و ریشه پونه معطر. (میانگین \pm SE). حروف یکسان میان فقدان اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است ($p \leq 0.05$).

Fig. 1. The effect of drought stress on the activity of A: superoxide dismutase and B: ascorbate peroxidase in the shoot and root of *Mentha pulegium* L. Different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.



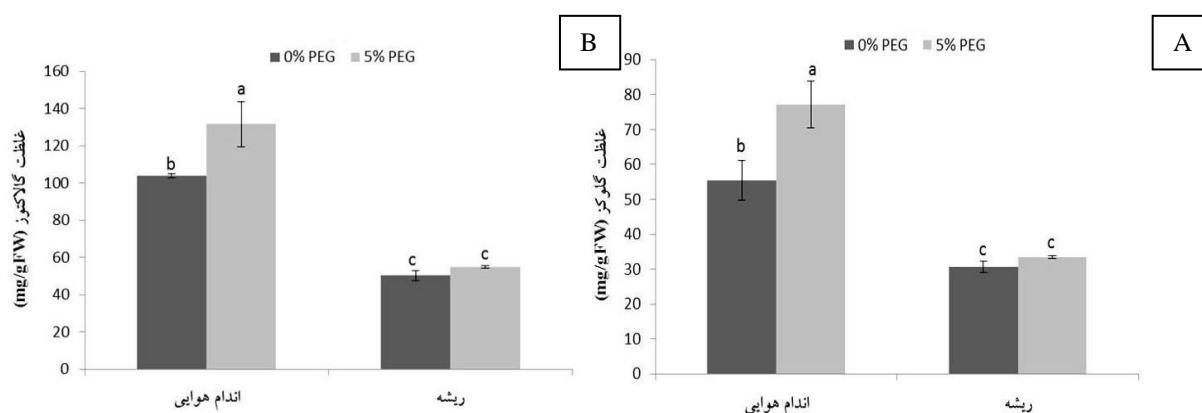
شکل ۲- اثر تنش خشکی بر A: میزان فعالیت کاتالاز و B: پراکسیداز در اندام هوایی و ریشه پونه معطر. (میانگین \pm SE). حروف یکسان میان فقدان اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است ($p \leq 0.05$).

Fig. 2. The effect of drought stress on the activity of A: catalase and B: peroxidase in the shoot and root of *Mentha pulegium* L. Different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.



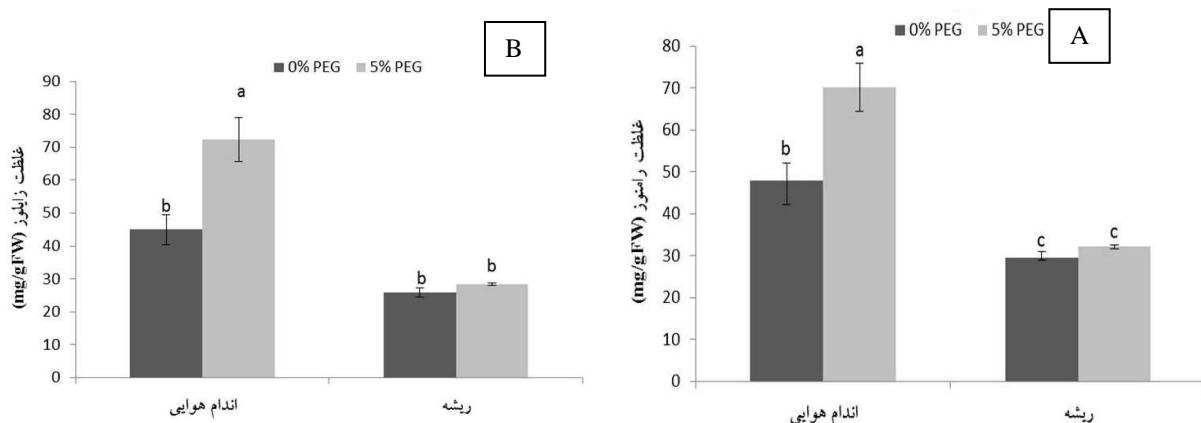
شکل ۳- اثر تنش خشکی بر محتوی MDA در اندام هوایی و ریشه پونه معطر (میانگین \pm SE). حروف یکسان میان فقدان اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است ($p \leq 0.05$).

Fig. 3. The effect of drought stress on the content of malondialdehyde in the shoot and root of *Mentha pulegium* L.. Different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.



شکل ۴- اثر تنش خشکی بر A: غلظت گلوكز و B: گالاكتوز در اندام هوایی و ریشه پونه معطر. (ميانگين \pm SE). حروف يكسان مبين فقدان اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است ($p \leq 0.05$).

Fig. 4. The effect of drought stress on the content of A: glucose and B: galactose in the shoot and root of *Mentha pulegium* L. Different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.



شکل ۵- اثر تنش خشکی بر A: غلظت رامنوز و B: زايلوز در اندام هوایی و ریشه پونه معطر. (ميانگين \pm SE). حروف يكسان مبين فقدان اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است ($p \leq 0.05$).

Fig. 5. The effect of drought stress on the content of A: rhamnous and B: xylose in the shoot and root of *Mentha pulegium* L. Different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

پژوهشی بر روی گیاه کلزا که با غلظت‌های مختلف PEG انجام گرفت، افزایش فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز در رقم مقاوم کلزا تحت تیمار PEG ۵درصد به صورت معنی‌دار مشاهده شد، در حالی که در رقم حساس آن تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم مشاهده نشد (Mirzaei, 2000). این مسئله نشان‌دهنده وجود سازوکارهای دفاعی متفاوت در برابر گونه‌های فعل اکسیژن در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس است. کاتالاز در تبدیل پراکسید-هیدروژن به آب و اکسیژن نقش دارد تا از اثر سمی پراکسید-هیدروژن جلوگیری نماید. تنش خشکی در این مطالعه موجب افزایش فعالیت کاتالاز در اندام هوایی و ریشه گیاه پونه معطر شد.

فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز نشان داد (Ozkur *et al.*, 2009) شواهد تجربی نشان داده است که آسکوربات‌پراکسیداز در شرایط تنش اکسیداتیو نسبت به سوپراکسیدیدیسموتاز ناپایدارتر است (Chagas *et al.*, 2008). با توجه به کاهش معنی‌دار فعالیت سوپراکسیدیدیسموتاز در اندام هوایی و عدم تغییر معنی‌دار فعالیت آن در ریشه، به نظر می‌رسد تولید هیدروژن‌پراکسید که محصول فعالیت سوپراکسیدیدیسموتاز است، کاهش یافته، بنابراین نیاز به حذف هیدروژن‌پراکسید به کمک آسکوربات‌پراکسیداز کاهش پیدا کرده است و می‌تواند دلیلی بر عدم تغییر معنی‌دار فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز در پونه معطر تحت تنش خشکی باشد. در

میزان قند در گیاهان دیگری مانند ارقام مختلف برنج Johari & Rahimi-Eichi, 2009) و گندم (Mostajeran & Tarhan, 2010) شد. در شرایط تنش خشکی، تنظیم کننده‌های اسمزی می‌تواند قدرت جذب آب را توسط (Slama *et al.*, 2007; Hassanpour *et al.*, 2013; Ahanger *et al.*, 2013) بنا براین، میزان تجمع این تنظیم کننده‌های اسمزی می‌تواند با مقاومت به خشکی مرتبط باشد و احتمالاً به همین دلیل کشت گیاه پونه‌معطر در مناطق خشک نیز بازدهی خوبی دارد.

نتیجه‌گیری

بنابراین نتایج این تحقیق نشان داد که تنش خشکی موجب افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و میزان پراکسیداز اسیون لپیدی و کاهش فعالیت سوپراکسیدیسموتاز و پراکسیداز اندام هوایی و افزایش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز ریشه پونه‌معطر شد. گرچه فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز در اندام هوایی و ریشه تفاوت معنی داری را در گیاهان تحت تیمار نشان نداد. همچنین تنش خشکی سبب افزایش میزان قندهای محلول گلوکز، گالا-کتوز، رامنوز و زایلوز در اندام هوایی گیاه پونه‌معطر شد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین میزان قندهای محلول تنش خشکی در پونه‌معطر نشان دهنده تحمل نسبی این گیاه در سطوح پایین خشکی است.

سپاسگزاری

نویسنده‌گان سپاسگزار همکاری‌های مسئولین آزمایشگاه‌های دانشگاه گیلان و دانشگاه تربیت‌مدرس تهران در طول اجرای این تحقیق هستند.

REFERENCES

- Ahanger, M., Tyagi, S., Wani M. and Ahmad, P. 2013. Drought tolerance: role of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. – Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment, eds Ahmad P., Wani M. R., editors. (New York, NY: Springer; Science), 1: 25-55.
 Attia, H., Arnaud, N., Karray, N. and Lachaâl, M. 2008. Long-term effects of mild salt stress on growth, ion

افزایش فعالیت کاتالاز، نشان دهنده مهار کارآمد نسبت به پراکسیداز هیدروژن می‌باشد. نتایج مشاهده شده در این پژوهش با مطالعه Tarhan and Candan (2012) بر روی پونه‌معطر تحت تنش خشکی هموارانی داشت. اگرچه در مطالعه Hasanpour and Niknam (2014) تأثیر تنش کمبود آب سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات‌پراکسیداز، سوپراکسیدیسموتاز و پراکسیداز شد، ولی فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت. در حالی که در طول دوره تنش، غشای پلاسمایی چهار آسیب می‌شود، آنزیم پراکسیداز در جمع آوری گونه‌های فعال اکسیژن به منظور جلوگیری از آسیب بیش از حد بر روی غشای پلاسمایی فعال است. یکی از محصولات نهایی پراکسیداسیون لپیدهای غشایی در اثر آسیب گونه‌های فعال اکسیژن، مالون دی‌آلدئید (MDA) است. پایین بودن میزان MDA، نشان دهنده پایین بودن آسیب واردہ در اثر تنش به غشای سلولی است که خود به معنای مقاومت بودن گیاه به تنش واردہ است (Hasanuzzaman *et al.*, 2014). از آنجا که فعالیت پراکسیداز در ارتباط با میزان پراکسیداسیون لپیدهای غشایی است، افزایش معنی دار میزان MDA اندام هوایی گیاهان تحت تنش، نشان دهنده عدم کفایت سطح فعالیت آنزیم پراکسیداز در جمع آوری گونه‌های فعال اکسیژن جهت جلوگیری از آسیب به غشاء و تولید MDA است، که با کاهش معنی دار فعالیت پراکسیداز در اندام هوایی پونه‌معطر همبستگی دارد. از سوی دیگر می‌توان ملاحظه کرد که افزایش فعالیت پراکسیداز در ریشه گیاهان تحت تنش نسبت به حالت شاهد، با عدم تغییر در سطح MDA ریشه این گیاهان هم خوانی داشت. نتایج بدست آمده با مشاهدات Mirzaei (2000) بر روی دو رقم حساس و مقاوم کلزا تحت تنش خشکی مطابقت دارد.

بسیاری از شرایط تنش زای محیطی بر متابولیسم قندها در گیاهان در حال رشد اثر می‌گذارند. نتایج این آزمایش نشان داد که تنش خشکی سبب افزایش معنی دار قندهای محلول گلوکز و گالا-کتوز، رامنوز و زایلوز در اندام هوایی پونه‌معطر شد. افزایش مقدار قندهای محلول تحت شرایط خشکی و شوری توسط محققین دیگری نیز گزارش شده است. اعمال تنش خشکی موجب افزایش

- accumulation and superoxide dismutase expression of *Arabidopsis* rosette leaves. – *Physiol. Plant.* 132: 293-305.
- Cakmak, I. and Horst, W.** 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tip of soybean (*Glycine max*). – *Pl. Physiol.* 83: 463-468.
- Candan, N. and Tarhan, L.** 2012. Tolerance or sensitivity responses of *Mentha pulegium* to osmotic and waterlogging stress in terms of antioxidant defense systems and membrane lipid peroxidation. – *Environm. Exp. Bot.* 75: 83-88.
- Chagas, R., Silveira, J., Ribeiro, R., Vitorello, V. and Carrer, H.** 2008. Photochemical damage and comparative performance of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress. – *Pestic. Biochem. Physiol.* 90: 181-188.
- Chalchat, J., Gorunovic, M., Maksimovic, Z. and Petrovic, S.** 2000. Essential oil of wild growing *Mentha pulegium* L. from Yugoslavia. – *J. Essential Oil Res.* 12: 598-600.
- Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., Pagán, R. and Laglaoui, A.** 2014. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. – *Innov. Food Sci. Emer. Technol.* 22: 221-229.
- Cruz de Carvalho, M.** 2008. Drought stress and reactive oxygen species. – *Pl. Signal. Behav.* 3: 156-165.
- De Vos, C., Schat, H., De Waal, M., Vooijs, R. and Ernst, W.** 1991. Increased resistance to copper-induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. – *Physiolol. Plant.* 82: 523-528.
- DuBois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. and Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. – *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Foyer, C., Lelandais, M. and Kunert, K.** 1994. Photooxidative stress in plants. – *Physiol. Plant.* 92: 696-717.
- Ghanati, F., Morita, A. and Yokota, H.** 2002. Induction of suberin and increase of lignin content by excess Boron in tobacco cell. – *Soil Sci. Plant Nutr.* 48: 357-364.
- Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K.** 1977. Superoxide dismutases I. occurrence in higher plants. – *Pl. Physiol.* 59: 309-314.
- Hajlaoui, H., Trabelsi, N., Noumi, E., Snoussi, M., Fallah, H., Ksouri, R. and Bakhrouf, A.** 2009. Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. – *World J. Microb. Biot.* 25: 2227-2238.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Gill, S.S. and Fujita, M.** 2014. Drought stress responses in plants, oxidative stress, and antioxidant defense. – In: Gill, S.S., Tuteja, N. (ed.): Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance 18: 209-249.
- Hassanpour, H., Khavari-Nejad, R.A., Niknam, V., Najafi, F. and Razavi, K.** 2012. Effects of penconazole and drought stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). – *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 1537-1549.
- Hassanpour, H. and Niknam, V.** 2014. Effects of water stress on plant growth and activity of antioxidant enzymes fragrant oregano (*Mentha pulegium* L.) at flowering stage. – *Plant Proc. Funct. J.* 8: 25-34.
- Hassanpour, H., Khavari-Nejad, R.A., Niknam, V., Najafi, F. and Razavi, K.** 2013. Penconazole induced changes in photosynthesis, ion acquisition and protein profile of *Me-ntha pulegium* L. under drought stress. – *Physiol. Mol. Bio. Plants* 19: 489-498.
- Hojati, M., Modarres-Sanavy, S.A.M., Karimi M. and Ghanati, F.** 2011. Responses of growth and antioxidant systems in *Carthamus tinctorius* L. under water deficit stress. – *Acta Physiolol. Plant.* 33: 105-112.
- Hussain, A.I., Anwar, F., Nigam, P.S., Ashraf, M. and Gilani, A.H.** 2010. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. – *J. Sci. Food Agri.* 90: 1827-1836.
- Jafari, S., Majd, A. and Sharei, F.** 2013. The effect of salinity stress on growth of *Mentha pulegium* L. vegetative. – *J. Pl. Res.* 30: 41-51.
- Jiang, M. and Zhang, J.** 2002. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. – *J. Exper. Bo-tany* 53: 2401-2410.
- Johari-Pireivatou, M.** 2010. Effect of soil water stress on yield and proline content of four wheat lines. – *African J. Biotec.* 9: 36-40.
- Kamkar, A., Jebelli Javan, A., Asadi, F. and Kmali-nejad, M.** 2010. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pu-legium* extracts and essential oil in sunflower oil. – *Food Chem. Toxicol.* 48: 1796-1800.
- Linsmaier, E.M. and Skoog, F.** 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. – *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
- Liu, Z.J., Zhang, X.L., Bai, J.G., Suo, B.X., Xu, P.L. and Wang, L.** 2009. Exogenous paraquat changes antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in drought-stressed cucumber leaves. – *Sci. Horticu.* 121: 138-143.
- Lokhande, V.H., Nikam, T.D. and Penna, S.** 2010. Bioc-hemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L.. – *Plant Cell. Tiss. Org.* 102: 17-25.
- Mahboubi, M. and Hagh, G.** 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. – *J. Ethnopharmacol.* 119: 325-327.
- Miller, G., Suzuki, N. and Ciftci-Yilmaz, S.** 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. – *Plant Cell and Enviro.* 33: 453-467.
- Mirzaei, M.** 2000. The study of drought stress on germination and seedling growth in some of canola cultiv-

- ars. – Master's thesis, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University.
- Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
- Mostajeran, A. and Rahimi-Eichi, V.** 2009. Effects of drought stress on growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars and accumulation of proline and soluble sugars in sheath and blades of their different ages leaves. – *Am. Eurasian J. Agric. Environm. Sci.* 5: 264-272.
- Naghibi, F., Mosaddegh, M., Mohammadi Motamed, M. and Ghorbani, A.** 2005. Labiate family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. – *Iranian J. Pharma. Res.* 2: 63-79.
- Nakano, Y. and Asada, K.** 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. – *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.
- Nickavar, B., Alinaghi, A. and Kamalinejad, M.** 2008. Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. – *Iranian J. Pharma. Res.* 7: 203-209.
- Nikolić, M., Jovanović, K.K., Marković, T., Marković, D., Gligorijević, N., Radulović, S. and Soković, M.** 2014. Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. – *Ind. Crop. Prod.* 61: 225-232.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S.O.N.J.A., Driscoll, S., Novitskaya, L. and Foyer, C.H.** 2002. Drought and oxidative load in the leaves of C₃ plants: a predominant role for photorespiration. – *Ann. Bot.* 89: 841-850.
- Oueslati, S., Karray-Bouraoui, N., Attia, H., Rabhi, M., Ksouri, R. and Lachaal, M.** 2010. Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (pennyroyal) to salt stress. – *Acta Physiol. Plant.* 32: 289-296.
- Ozgen, U., Mavi, A., Terzi, Z., Yildirim, A., Coskun, M. and Houghton, P.J.** 2006. Antioxidant properties of some medicinal Lamiaceae (Labiatae) species. – *Pharm. Biol.* 44: 107-112.
- Ozkur, O., Ozdemir, F., Bor, M. and Turkan, I.** 2009. Physiochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte *Capparis ovata* Desf. to drought. – *Environm. Exp. Bot.* 66: 487-492.
- Shahmohamadi, R., Sariri, R., Rasa, M., Ghafoori, H., Ma-hmudreza, A., Nasuti, S. and Tahery, M.** 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of flowering aerial parts *Mentha Pulegium* from Gilan. – *Pharmacol.* 3: 651-659.
- Shahmohamadi, R., Sariri, R., Rasa, M. and Aghamali, M.** 2014. Antioxidant activity of Gilan *Mentha pulegium* during growth. – *Pakistan J. Bio. Sci.* 17: 380-387.
- Sharma, P., Jha, A., Dubey, R. and Pessarakli, M.** 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and anti-oxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. – *J. Bot.* 14: 1-26.
- Shirazi, F.H., Ahmadi, N. and Kamalinejad, M.** 2004. Evaluation of northern Iran *Mentha pulegium* cytotoxicity. – *Daru J.* 12: 106-110.
- Sivritepe, N., Erturk, U., Yerlikaya, C., Turkan, I., Bor, M. and Ozdemir, F.** 2008. Response of the cherry rootstock to water stress induced in vitro. – *Bio. Plant.* 52: 573-576.
- Slama, I., Ghnaya, T., Hessini, K., Messedi, D., Savouré, A. and Abdelly, C.** 2007. Comparative study of the effects of mannitol and PEG osmotic stress on growth and solute accumulation in *Sesuvium portulacastrum*. – *Environm. Exp. Botany* 61: 10-17.
- Soares, P., de Freitas Pires, A., de Souza, E., Assreuy, A. and Criddle, D.** 2012. Relaxant effects of the essential oil of *Mentha pulegium* L. in rat isolated trachea and urinary bladder. – *J. Pharm. and Pharmacol.* 64: 1777-1784.
- Van Den Berg, L. and Zeng, Y.** 2006. Response of South African indigenous grass species to drought stress induced by polyethylene glycol (PEG) 6000. – *South African J. Bot.* 72: 284-286.
- Wen-Bin, W., Yun-Hee, K., Haeng-Soon, L., Ki-Yong, K. and Xi-Ping, D.** 2009. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. – *Plant Physiol. Biochem.* 47: 570-577.

How to cite this article:

Afsharmohamidian, M., Ghanati, F., Ahmadiani, S. and Sadrzamani, K. 2016. Effect of drought stress on the activity of antioxidant enzymes and soluble sugars content of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). – *Nova Biol. Rep.* 3: 228-237.

افشارمحمدیان، م.، قناتی، ف.، احمدیانی، س. و صدرزمانی، ک. ۱۳۹۵. اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان قندهای محلول پونه معطر (*Mentha pulegium* L.). – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۳: ۲۲۸-۲۳۷.